

## · 论 著 ·

## 商陆皂苷甲作用于子宫内膜异位症大鼠腹腔巨噬细胞蛋白质组的差异分析

王 婧,肖振宇,邱 磊,张俊平(第二军医大学药学院生化药学教研室,上海 200433)

**[摘要]** 目的 研究商陆皂苷甲作用于子宫内膜异位症大鼠腹腔巨噬细胞蛋白质组的差异, 鉴定差异表达的蛋白质。方法 采用自体移植法建立子宫内膜异位症大鼠模型。造模成功后取腹腔巨噬细胞, 商陆皂苷甲作用 24 h 后, 采用双向凝胶电泳技术分离巨噬细胞总蛋白, 并获得药物组、模型组和空白对照组蛋白质组图谱, PDQuest 软件分析确认三组细胞的差异蛋白质, 最后运用串联飞行时间质谱 (MALDI-TOF/TOF MS) 鉴定差异蛋白点。结果 M2 型丙酮酸激酶、磷酸酰肌醇转移蛋白和热休克蛋白 8 在子宫内膜异位症大鼠腹腔巨噬细胞中高表达, 而磷酸甘油醛脱氢酶表达减少。商陆皂苷甲能抑制造模引起的 M2 型丙酮酸激酶等四种蛋白的表达变化。结论 利用蛋白质组学技术, 研究商陆皂苷甲作用于子宫内膜异位症大鼠腹腔巨噬细胞后蛋白表达差异, 为探索子宫内膜异位症的发病机制和商陆皂苷甲的作用机制提供新的线索和依据。

**[关键词]** 商陆皂苷甲; 子宫内膜异位症; 巨噬细胞; 双向电泳

**[中图分类号]** R96 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)06-0410-05

## Differential proteomics analysis of peritoneal macrophages in endometriosis rat treated by Esculentoside A

WANG Jing XIAO Zhenyu QIU Lei ZHANG Junping (Department of Microbial and Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the differential proteomics of the peritoneal macrophages in experimental endometriosis rats treated by EsA. **Methods** Experimental endometriosis was induced by auto transplantation of endometrium. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) combined with MALDI-TOF/TOF identification were used to investigate the effects of EsA on the proteome of macrophages of experimental endometriosis rats. **Results** Compared with normal controls pyruvate kinase3 (PKM2), phosphatidylinositol transfer protein (PIIPN), and heat shock protein 8 (HSP8) had higher expression in peritoneal macrophages of experimental endometriosis but glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) expressed lower. However, these aberrant expression could be inhibited by EsA. **Conclusion** It was revealed a potential mechanism of the pathogenesis of endometriosis which gave a new sight to understand the anti-inflammatory effects of EsA and its underlying immunoregulation mechanism.

**[Key words]** Esculentoside A; endometriosis macrophage; two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是一种常见的雌激素依赖性疾病, 是指具有生长功能的子宫内膜组织 (腺体和间质) 出现在子宫腔被覆内膜及宫体肌层以外的其他部位<sup>[1]</sup>, 属良性疾病, 但具有侵袭、扩散等恶性肿瘤的生长特征。

对于行经期妇女而言, 脱落的子宫内膜发生异地种植的几率高达 76% ~ 90%, 但是实际上 EMs 的发生率仅为 5% ~ 10%<sup>[2]</sup>。研究发现 EMs 患者巨噬细胞体积增大, 非特异性免疫功能异常, 吞噬异物能

力下降。由其分泌的活性物质明显增多, 这些物质有利于异位内膜种植生长<sup>[3]</sup>。因此, 在 EMs 发生发展中, 巨噬细胞起到极其重要的作用。

商陆皂苷甲 (esculentoside A, EsA) 是传统中药商陆 (*Phytolacca esculenta* Van Houtte) 中含量最高的皂苷。商陆总皂苷 (囊癖灵) 治疗子宫内膜异位症获专利, 治疗卵巢囊肿和乳腺增生已获准进入 II 期临床。前期研究发现 EsA 具有显著的抗炎免疫抑制作用, 抑制多种细胞特别是巨噬细胞释放多种细胞因子和炎性介质以及表达粘附分子, 还对多种急性炎症模型具有显著的治疗作用<sup>[4-6]</sup>。这些研究结果提示: EsA 对巨噬细胞功能的作用和对其分泌的炎性介质的调节作用可能是其治疗 EMs 的机制

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30600766)。

[作者简介] 王 婧 (1985-), 女, 硕士研究生。E-mail: dearfriendwang@163.com。

[通讯作者] 张俊平。E-mail: jzhang08@hotmail.com。

之一。

笔者运用蛋白质组技术,研究 EsA 对 EMs 大鼠腹腔巨噬细胞的作用蛋白的影响,以期更深入的了解 EMs 发生发展的分子机制以及 EsA 抗炎免疫的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 药品试剂和仪器** EsA (纯度 > 99%) 用培养液溶解。DMEM 培养基购自 GIBCO 公司。胎牛血清购自 HYCLONE 公司。IPG 干胶条 (ReadyStrip™ IPG Strip 17 cm, pH 3-10)、等电聚焦上样缓冲液 (Ready-Prep 2-D Starter Kit Rehydration/Sample Buffer)、矿物油、溴酚蓝、蛋白纯化试剂盒、蛋白定量试剂盒 (RC DC Protein Assay Kit)、碘乙酰胺 (IAA) 等为 Bio-Rad 公司产品;二硫苏糖醇 (DTT) 等为 Sigma 公司产品;蛋白酶抑制剂是 Roche 公司产品;其他试剂均为化学分析纯;双向凝胶电泳第一向等电聚焦仪、第二向大型聚丙烯酰胺凝胶系统、GS800 扫描仪为 Bio-Rad 公司产品;Millipore 纯水仪为 Millipore 公司;双向凝胶电泳图像分析软件是 PDQuest™ 2D Analysis software 7.4.0 (Bio-Rad);质谱仪为 4700 串联飞行时间质谱仪 [4700 Proteomics Analyzer (TOF/TOFIM) (Applied Biosystems USA)]。

**1.2 动物** 雌性 SD 大鼠 20 只,清洁级,体重 220 ~ 250 g 医动字第 0039456 号,由第二军医大学实验动物中心提供。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 分组及模型制作** 术前一天皮下注射己烯雌酚 (1 mg/kg),使动物统一处于动情期,随机分为正常对照组 (7 只) 和模型组 (13 只)。手术在无菌条件下用 1% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 量腹腔麻醉,常规开腹,钝镊找到并切取右侧宫角处的一段子宫,长约 1 cm,迅速将其置于生理盐水中,将子宫内膜与肌层分离,并剪取两块各约 5 mm × 5 mm 的内膜组织块,将上层反向对着体壁,将组织块四角缝固在腹壁上,左右各一。右侧宫角断端吻合结扎。关腹前予以庆大霉素生理盐水溶液冲洗腹腔,最后缝合各层组织,4 周后再次剖腹观察移植物生长状况,发现移植物体积增大,出现液体积聚,移植物被结缔组织或大网膜覆盖并有血管形成。同时切取移植物送检,证实移植物中有子宫内膜上皮细胞、腺体及间质的生长,并有分泌活动。说明子宫内异位大鼠模型成功建立。

**1.3.2 大鼠腹腔巨噬细胞 (peritoneal macrophage, PMΦ) 的分离培养** 造模 4 周后取大鼠腹腔巨噬细胞,实验 4 天前每只大鼠腹腔注射 5 ml 3% TG-

broth 乙醚吸入法麻醉,无菌条件下 15 ml 预冷 PBS 腹腔灌洗 3 次,回收液 4 °C、1 000 r/min 离心 10 min 去上清,加入 10% 胎牛血清的 DMEM 调整 PMΦ 浓度为  $2 \times 10^6$  /ml 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 6 h 去上清,用 PBS 液洗去未贴壁细胞,然后加入 EsA (5 mmol/L) 再孵育 24 h,实验同时设不加药的模型组以及正常大鼠腹腔巨噬细胞的空白对照组。

**1.3.3 细胞总蛋白的制备** 收集各组细胞, PBS 漂洗细胞 2 次, Millipore 水漂洗一次以除去盐分,加入裂解缓冲液冰上裂解 10 min, 收集蛋白样品 - 80 °C 反复冻融 3 次, 4 °C 条件下 20 000 r/min 离心 1 h, 经蛋白纯化试剂盒纯化蛋白后用蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。蛋白样品 - 80 °C 保存。

**1.3.4 双向电泳** 取 350 μl 含 400 μg 蛋白的上样缓冲液,被动水化 7 h。水化和聚焦均在 20 °C 进行,等点聚焦极限电流为 55 μA /gel 程序设置为: 50 V, 3 h 250 V, 3 h 1 000 V, 2 h 线性升压到 10 000 V; 快速聚焦 60 000 Vhr 最后 500 V 保持。第一向等点聚焦结束后,取出胶条放在平衡缓冲液 I (6 mol/L 尿素, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris, 20% 甘油, 2% DTT) 中平衡 12 min, 在平衡缓冲液 II (6 mol/L 尿素, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris, 20% 甘油, 2.5% IAA) 中平衡 12 min。将平衡后的胶条转移至 12% 聚丙烯酰胺凝胶上端,进行 SDS-PAGE 分离,电泳采用恒流方式,起始时用低电流 (5 mA /gel/17 cm), 待样品完全走出 IPG 胶条浓缩成一条线后,加大电流 (25 mA /gel/17 cm), 待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳。凝胶用银染法进行染色。

**1.3.5 图像采集分析** 银染后的 2-D 胶用 GS800 扫描仪进行扫描,获得蛋白质点图像。所得图谱用 PDQuest 图像分析软件进行分析,分析过程包括蛋白质点的检测、获取蛋白质斑点位置坐标、背景消减、手工加减点、差异蛋白点的分析等。在本实验中用相同的条件对药物处理组、模型组和空白对照组分别进行了 3 次双向电泳。在每组的蛋白质电泳图谱中选择点清晰、背景好的图像作为参照胶,与组内其他 3 次实验的图像进行匹配,并建立平均胶;以实验组、模型组和对照组的平均胶进行两两匹配,寻找 3 组细胞的差异表达蛋白。

**1.3.6 串联飞行时间质谱鉴定差异蛋白点** 本部分采用 MALDI-TOF-TOF MS 的方法鉴定蛋白,将选取的差异蛋白质点切下,胰蛋白酶水解后得到该蛋白质的多肽片段混合物,用 4700 串联飞行时间质谱仪 [4700 Proteomics Analyzer (TOF/TOFIM) (Applied Biosystems USA)] 进行质谱分

析, 激光源为 355 nm 波长的 Nd: YAG 激光器, 加速电压为 20 kV, 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。基质和样品的 PMF 质量扫描范围为 700~ 3 500 Da 将强度最大的 5 个峰进行串联质谱分析, 谱图用 myoglobin 酶解肽段进行外标校正。所得结果用 GPS (Applied Biosystems USA) MASCOT (Matrix Science, London, UK) 进行数据库检索。搜索参数设置: 数据库为 NCBI nr 数据检索的方式为 combined 最大允许漏切位点为 1; 酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置: PMF 100 ppm, MS/MS 0.6 Da 在数据库检索时胰酶自降解峰和污染物质的峰都手工剔除。

## 2 结果

**2.1 双向电泳凝胶图谱** 经 GS-800 图像采集和 PDQuest 分析软件分析, 得到 EsA 处理组, 模型组, 对照组蛋白点总数分别为  $1\,005 \pm 36$ ,  $943 \pm 31$ ,  $814 \pm 24$ 。由于大鼠的个体差异, 同时不同生理周期细胞蛋白的表达也会发生变化, 将这 3 组图谱进行对比分析, 3 组细胞中均稳定表达的点有 217 个。其中, 7 个蛋白质点在子宫内膜异位症模型组的含量明显增高, 2 个蛋白质点在模型组中含量明显降低, EsA 能明显抑制由于造模导致的蛋白表达变化。(见图 1)

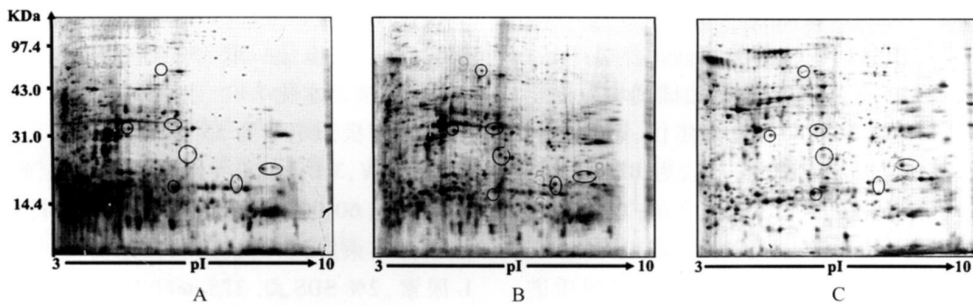


图 1 双向电泳图谱

A 正常大鼠腹腔巨噬细胞的对照组; B 大鼠子宫内膜异位症模型组; C-EsA (5 mmol/L) 作用于模型组巨噬细胞 24 h 后的药物处理组。(横轴和纵轴分别代表蛋白质的等电点 (pI) 和分子量 (Mr)。差异显著的蛋白用圆圈圈出。)

**2.2 质谱鉴定结果** 将 9 个蛋白质差异点胶内切割、消化、酶解后, 利用 MALDI-TOF-TOF MS 鉴定得到 6 个蛋白质, 蛋白的具体信息在表 1 中显示。对比双向电泳图谱, 得出 M2 型丙酮酸激酶 (pyruvate kinase3, PKM2), 磷酸酰肌醇转移蛋白 (phosphatidyl

inositol transfer protein, PIP2N) 和热休克蛋白 8 (heat shock protein 8, HSP8) 在子宫内膜异位症模型大鼠巨噬细胞中高表达, 而磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 在子宫内膜异位症模型大鼠巨噬细胞表达降低。

表 1 差异蛋白的质谱鉴定结果

序号	数据库编号	名称	相对分子量	等电点	蛋白质得分	可信区间 (%)
1	gil62665891	pyruvate kinase3 (PKM2)	57 840 1	7.57	258	100
2	gil62665891	pyruvate kinase3 (PKM2)	57 840 1	7.57	151	100
4	gil8393962	phosphatidylinositol transfer protein (PIP2N)	31 887 1	5.97	112	100
5	gil13242237	heat shock protein 8 (HSP8)	70 827 2	5.37	535	100
6	gil13242237	heat shock protein 8 (HSP8)	70 827 2	5.37	370	100
7	gil120707	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)	35 813 3	8.43	228	100

## 3 讨论

腹腔内巨噬细胞对逆流内膜的清除及免疫应答能力下降, 可能是造成异位灶存活的重要机制。以往研究发现, 巨噬细胞数目和功能的改变及其分泌细胞因子的异常, 如白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-6 (IL-6) 和转化生长因子  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )、血管内皮

生长因子 (VEGF) 等可能导致卵巢功能的改变<sup>[7-9]</sup>, 进而与 EMS 的发生发展相关。然而, 从巨噬细胞蛋白质组水平研究子宫内膜异位症的发病机制尚未见报道。

笔者通过构建子宫内膜异位症大鼠模型, 运用双向电泳联合质谱技术研究巨噬细胞蛋白质组表达差异, 结果显示, PKM2, PIP2N 和 HSP8 在 EMS 模型

大鼠巨噬细胞中高表达,而 GAPDH 表达降低。

PKM 2 是近年来研究较多的一种新型肿瘤标记物,在许多恶性肿瘤如肾细胞癌、胰腺癌、乳腺癌、宫颈癌,肺癌以及胃肠道癌发生发展中有重要作用<sup>[10-11]</sup>。PKM 2 可以调节糖酵解的磷酸代谢物供应以合成细胞增殖的前身物。其表达上调提高了细胞的 ATP 浓度,为肿瘤细胞特殊的代谢途径提供能量<sup>[12]</sup>。EMs 大鼠腹腔巨噬细胞 PKM 2 表达上调,可使糖酵解速度失控性增加,有利于提供能量用于内膜细胞的增殖。

GAPDH 除了作为糖酵解酶以外,还具有一些非糖酵解功能。研究表明 GAPDH 介导一个新的细胞死亡级联反应<sup>[13]</sup>,通过一氧化氮使 GAPDH 与 Siah 1 蛋白结合,GAPDH-Siah 1 转位到细胞核。正常情况下,Siah 1 很快转化,但是与 GAPDH 结合后其转化减慢,从而引发特定的核蛋白降解而使细胞死亡。GAPDH 在子宫内膜异位症大鼠腹腔巨噬细胞表达下调,可能通过减少细胞凋亡来维持内膜细胞的恶性增殖。

HSP8 属于 HSP70 家族,是最保守的,也是研究最多的一类 HSP。在正常状态下,HSP70 以 ATP 依赖的分子伴侣行使功能,如帮助新生蛋白的折叠,组装多蛋白复合体和蛋白质的跨膜转运。然而除了作为分子伴侣行使功能,HSP 还可以作为直接的感受器,感受细胞静息、凋亡、坏死等信号<sup>[14]</sup>。研究还发现 HSP70 在人乳腺癌中高表达且是肿瘤生存所必需的<sup>[15]</sup>,用各种方法将 HSP70 从肿瘤细胞中清除可诱导肿瘤细胞凋亡。除此之外,重组的 HSP70 可以刺激 IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-2 的生成,上调单核细胞和树突细胞 CD86 和 MHC II<sup>[16]</sup>,表明 HSP70 有免疫调节功能。那么它在巨噬细胞中表达上调与子宫内膜异位症的发生有怎样的关系,EsA 下调 HSP70 的表达与 EsA 抗炎免疫作用机制之间又能建立怎样的联系,还有待进一步研究。

PITP 广泛分布于真核生物的各个组织中,在真核生物细胞内具有很多重要且保守的功能<sup>[17]</sup>。通过基因剔除、功能互补以及蛋白相互作用等手段对 PITP 生理功能的研究发现,PITP 不但和真核生物细胞内膜系统间的磷脂转运和交换有关,还参与磷脂信号的调节、影响胞外分泌过程、参与细胞周期的调节以及胞浆运动等生理过程,对哺乳动物的神经退化和肠吸收疾病有着重要影响<sup>[18]</sup>;然而他在子宫内膜异位症发病机制中起着什么样的作用,目前还不清楚,有待进一步研究。

总之,本实验为从蛋白质组水平研究子宫内膜异位症发病机制以及揭示 EsA 抗炎免疫的作用机制提供了新的证据。但仅为研究的一个开端,为更

深入的在两者之间建立联系,还需要更进一步的研究和论证。

## 【参考文献】

- [1] Berkley KJ, Rapkin A J, Papka RE. The pains of endometriosis [J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1587
- [2] Viganò P, Parazzini F, Samigliana E, *et al*. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004, 18(2): 177
- [3] Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, *et al*. Differential macrophage infiltration in early and advanced endometriosis and adjacent peritoneum [J]. *Fertil Steril* 2004, 81(3): 652
- [4] Xiao ZY, Zheng QY, Zhang JP, *et al*. Effect of esculetin on autoimmunity in mice and its possible mechanism [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2002, 23(7): 638
- [5] Xiao ZY, Zheng QY, Jiang YY, *et al*. Effects of esculetin on production of interleukin-1, 2 and prostaglandin E2 [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2004, 25(6): 817
- [6] Xiao Z, Su Y, Yang S, *et al*. Protective Effect of Esculetin on Radiation-Induced Cutaneous Toxicity [J]. *Int J Radiat Oncol* 2006, 65(3): 882
- [7] Konderc Anasz Z, Sikora J, Mielczarek-Palcza A, *et al*. Concentrations of interleukin (IL)-1 $\alpha$  and IL-1 soluble receptor type II (IL-1 sR II) and IL-1 receptor antagonist (IL-1 Ra) in the peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005, 123(2): 198
- [8] Falconer H, Mwendu M, Chai DC, *et al*. Treatment with anti-TNF monoclonal antibody (c5N) reduces the extent of induced endometriosis in the baboon [J]. *Hum Reprod* 2006, 21(7): 1856
- [9] Kawano Y, Fukuda I, Itoh H, *et al*. The effect of inflammatory cytokines on secretion of macrophage colony-stimulating factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human granulosa cells [J]. *Am J Reprod Immunol* 2004, 52(2): 124
- [10] Weinberger R, Appel B, Stein A, *et al*. The pyruvate kinase isoenzyme M 2 (Tu M2-PK) as a tumour marker for renal cell carcinoma [J]. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 2007, 16(4): 333
- [11] Hathusinghe HR, Goonetilleke KS, Sriwardena AK. Current status of tumour M 2 pyruvate kinase (tumour M2-PK) as a biomarker of gastrointestinal malignancy [J]. *Ann Surg Oncol* 2007, 14(10): 2714
- [12] Christofk HR, VanderHeiden MG, Wu N, *et al*. Pyruvate kinase M 2 is a phosphotyrosine-binding protein [J]. *Nature*, 2008, 452(7184): 181
- [13] Sen N, Hara MR, Komberg MD, *et al*. Nitric oxide induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis [J]. *Nat Cell Biol* 2008, 10(7): 866
- [14] Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, *et al*. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization [J]. *J Exp Med* 2004, 200(4): 425
- [15] Nylandsted J, Rohde M, Brand K, *et al*. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14): 7871

测试结果显示头孢曲松钠样品 B 所用胶塞采用埃克森 2211 溴化丁基橡胶作为原料, 加入少量石蜡。来源于胶塞的可挥发性物质包括丙烯醛、戊醛、己醛、2-甲基戊烷、3-甲基戊烷、正己烷、甲基环戊烷、环己烷、 $C_8H_{16}$ 、 $C_{10}H_{22}$ 、 $C_{10}H_{16}$ 、 $C_{13}H_{34}$ 、 $C_{14}H_{30}$ 、 $C_{15}H_{32}$ 、 $C_{16}H_{34}$ 、 $C_{13}H_{24}$ 、 $C_{13}H_{23}Br$ 、 $C_{21}H_{40}$ 、BHT 等物质。其中较低分子量的低沸点物质戊醛、己醛、2-甲基戊烷、3-甲基戊烷、正己烷、甲基环戊烷、环己烷、 $C_8H_{16}$  等可挥发性物质在 4 种 B 样品中的变化趋势与样品 A 一致, 同样表明这些来源于胶塞的低沸点物质未被头孢曲松钠所吸附。

测试结果同样表明来源于胶塞的较高沸点的  $C_{10}H_{22}$ 、 $C_{10}H_{16}$ 、 $C_{13}H_{34}$ 、 $C_{14}H_{30}$ 、 $C_{15}H_{32}$ 、 $C_{16}H_{34}$ 、 $C_{13}H_{24}$ 、 $C_{21}H_{40}$ 、BHT 等物质能够被头孢曲松钠所吸附。结果同样表明来源于胶塞的丙烯醛和  $C_{13}H_{23}Br$  与头孢曲松钠可能以非物理结合, 如化学反应的方式发生了进一步的作用。

总体而言, 测试结果同样表明来源于胶塞和来源于头孢曲松钠的可挥发性物质存在相互迁移, 头孢曲松钠能以物理吸附和非物理吸附的方式与来源于胶塞的部分可挥发性物质发生作用。

## 4 讨论

4.1 由于样品的胶塞与头孢曲松钠已经组合包装, 相关物质的迁移和相互作用已经发生, 这对可挥发性物质来源及其相互作用的判断造成干扰。为了判断这些可挥发性可迁移物质的来源及可能的相互作用, 对抗生素、胶塞与药物接触部位和胶塞与药物未接触部位分别测定, 并同时测定抗生素与胶塞的混合样品作为附加的判别依据。头孢曲松钠处于密封的环境, 因此来源于头孢曲松钠的可挥发性物质, 如果发生迁移, 应首先进入与抗生素接触的塞颈部位, 然后再扩散至塞冠部位, 因此可测得色谱峰面积顺序为头孢曲松钠、塞颈、塞冠; 而胶塞处在相对开放的环境, 塞冠部位的可挥发性物质可能迁移进入环境, 另外由于测试条件下, 胶塞和头孢曲松钠对不同

可挥发性物质的吸附能力不同, 导致可挥发性物质测得的色谱峰面积顺序没有一致的规律性, 因此需要结合胶塞配方工艺和头孢曲松钠的工艺进行判断。

4.2 胶塞可挥发性物质迁移进入头孢曲松钠以后, 如果仅仅是被物理吸附, 在头孢曲松钠样品中就能测得相关物质; 但如果以非物理吸附方式发生作用, 如发生化学反应, 头孢曲松钠样品中将无法测得这些物质, 并导致混合样品测得的色谱峰面积小于胶塞样品测得的色谱峰面积。实验结果表明来源于胶塞的可挥发性物质能够与头孢曲松钠以物理吸附和非物理吸附的方式发生作用。

4.3 来源于胶塞的可挥发性物质脂溶性一般较大, 这些能够迁移进入头孢曲松钠的物质性质也表明了这一点, 如果发生局部富集, 头孢曲松钠与这些物质物理吸附和非物理吸附的作用结果将使得部分头孢曲松钠粉末表面形成脂溶性膜, 使得粉末在水中的溶解度下降, 这可能是导致头孢曲松钠出现澄清度问题的因素之一。

4.4 通过对来源于胶塞的可挥发性物质测定, 并对其迁移进入头孢曲松钠的可能情况进行分析, 可以有效评价胶塞可挥发性物质对头孢曲松钠的影响, 为抗生素选择合适的胶塞以及相容性实验提供有效的实验数据

## 【参考文献】

- [1] 严幼达, 顾惠敏, 侯惠民. 胶塞对抗生素粉针剂质量的影响 [J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(4): 190
- [2] 邓凯顺, 王鹏辉, 宋 表, 等. 提高非无菌头孢曲松钠溶液澄清度的探讨 [J]. 河北医科大学学报, 2006, 27(5): 441
- [3] 肖全英, 谌雪芳, 曾环想, 等. 注射用头孢曲松钠的胶塞相容性研究 [J]. 广东药学院学报, 2004, 20(6): 610
- [4] Zhao X, Jin SH, Hu CQ. The effect of rubber closures on the haze state of ceftriaxone sodium for injection [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2007, 33(1): 35

[收稿日期] 2010-06-08

[修回日期] 2010-09-14

(上接第 413 页)

- [16] Kim HP, Morse D, Choi AM. Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies [J]. Expert Opin Ther Targets 2006, 10(5): 759
- [17] Böhm K, Li Y, Charlot F, et al. The Arabidopsis COW 1 gene encodes a phosphatidylinositol transfer protein essential for root hair tip growth [J]. Plant J 2004, 40(5): 686

- [18] Usumiya A, Owada Y, Yoshimoto T, et al. Localization of gene expression for phosphatidylinositol transfer protein in the brain of developing and mature rats [J]. Brain Res Mol Brain Res 1997, 45(2): 349

[收稿日期] 2010-05-26

[修回日期] 2010-07-01